

AZ AFRIKAI VÁNDORSÁSKA (*LOCUSTA MIGRATORIA* *MIGRATORIOIDES* Lj OCTOPAMINERG ÉS TIRAMINERG RENDSZERÉNEK BIOKÉMIÁJA

Nagy Lajos

PhD értekezés

Pécs

2002

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az octopamint (OA) 1951-ben izolálták az *Octopus vulgaris*-ből, nevét is innen kapta. A felfedezését követő néhány évtized jelentős eredményeket hozott, mivel a kutatások bizonyították, hogy az amerikai csótányban (*Periplaneta americana*) és számos más rovarban jelentős fiziológiai szerepe van. Azonosították számos gerinctelen központi idegrendszerében, és szerepe kiemelkedő a perifériás szövetek és érzékszervek működésének szabályozásában is. A tiramin (TA) és az OA jelentőségét fokozza, hogy jelenlegi tudásunk szerint egyedül ez a két nem peptid természetű neurotranszmitter képviseli azokat a neuroaktív anyagokat, melyek fiziológiai szerepét elsősorban gerinctelenekben bizonyították. Rovarok idegrendszerében az OA-ról egyértelműen bizonyították neuromodulátor szerepét is. A rovar agyban a TA-nak neurotranszmitter funkciót tulajdonítanak, ugyanakkor szubsztrát is az OA szintézise során. Gerincesekben mindkét fenolamin csak trace aminként fordul elő, fiziológiai szerepüket még nem tisztázták.

Evolúciós szempontból a fenolaminok és katecholaminok szintézisét konzervatív folyamatnak tekintik, mivel végtermékeiket illetően azonosak a gerincesekben leírt folyamatokkal. Az OA és a TA szintézisének és metabolizmusának egyes enzimatis lépései már tisztázottak, ugyanakkor még számos kérdés vár megválaszolásra.

Az eddigi kísérletek a gerincesekben leírt enzimatis útvonalat feltételezték rovarokban is. A folyamatokat katalizáló enzimek azonban különbségeket rejtenek. Rovarokban a fenolaminok (OA, TA) szintézise nem határolható el élesen a katecholaminok szintézisétől. A két enzimút vonal között elvileg a tirozin (TYR) és az átalakításában résztvevő enzimek teremtenek közvetlen kapcsolatot. Azt valószínűsítették, hogy TYR-ből a tirozin-hidroxiláz szintetizálja a DOPA-t, a rovarok idegrendszerében azonban jelenlétét és működését nem bizonyították egyértelműen, annak ellenére, hogy a központi idegrendszer ganglionjaiban magas a DA tartalom.

- Az ellentmondás feloldására vizsgáltuk, hogy mi a jelentősége a tirozin-hidroxiláznak a rovarok központi idegrendszerének katecholamin szintézisében. Ha szerepe háttérbe szorul, akkor milyen mechanizmus fedezi a központi idegrendszer DOPA szükségletét.

A DOPA → DA átalakulást az 5HTP/DOPA-dekarboxiláz katalizálja, működését sokoldalúan elemezték és perifériás szövetekből tisztították is, rovarok idegszövetéből azonban még nem. A TYR → TA átalakulás szintén dekarboxilációs folyamat, melyet a TYR-dekarboxiláz katalizál. Ez utóbbi enzim létezéséről csak közvetett bizonyítékok álltak rendelkezésre, idegszövetből még nem tisztították. Amennyiben jelenlétének direkt igazolása sikerrel jár azt mondhatjuk, hogy alapvető a különbség a gerincesekben végbemenő dekarboxilációs folyamathoz képest: a gerincesekben egy tág szubsztrátspecifitású dekarboxiláz, az aromás aminosav-dekarboxiláz, míg rovarokban két enzim, az 5HTP/DOPA- és a TYR-dekarboxilázok katalizálják a monoaminok szintézisének dekarboxilációs lépéseit.

- Kísérleteinkkel direkt bizonyítékot kerestünk a TYR-dekarboxiláz létezésére, és lehetséges szerepére.

A DOPA dekarboxilációját követően a DA-t a β -hidroxiláz alakítja noradrenalinná. Valószínűsíthető, hogy ugyanez az enzim felelős a TA \rightarrow OA átalakításért is.

A rovarok központi idegrendszerében a monoaminok enzimatisz inaktiválását az N-acetil transzferáz végzi. Rovarokban azonban nem választhatjuk el élesen a központi idegrendszer és a perifériás szövetek, így a haemolympha catecholaminok szintézisét és metabolizmusát. A folyamatba belépő és kilépő anyagok azonosak, mégis más-más a szerepük. Míg a DA és a NA a központi idegrendszerben végtermékek, az N-acetil-DA (NACDA) pedig metabolit, addig a perifériás szövetekben a DA közti termék és az NACDA a végtermék, mely a kutikulaképzési folyamatok egyik alap építőköveként hasznosul. A haemolympha sejteiben jelenlévő DOPA-dekarboxiláz aktivitást bizonyították, sejtben belüli lokalizációját szubsztrátspecifitását azonban nem ismertük.

- Munkánk során kerestük a lehetséges kapcsolatot a rovarok központi idegrendszerének és a haemolympha, mint perifériás szövet catecholamin szintézise és metabolizmusa között.

Az OA funkcionális szerepének szervszintű vizsgálata során kísérleti eredmények sokasága igazolta az OA receptor jelenlétét. A különböző receptor altípusok elkülönítésére azonban csak Evans (1981) kísérletei alapján vált lehetségessé. Munkájában részletesen elemezte az OA hatására létrejövő választ sáska ugróláb izom preparátumán. OA₁ és OA₂ típusú receptorokat különített el. Az OA₁ típusú receptor gátolta az endogén miogén ritmust, míg az OA₂ típusú receptor a neuromuszkuláris átvédést modulálta. Azt állapította meg, hogy az OA₁ receptor hírvívója az intracelluláris kalcium, míg az OA₂ receptoré az adenilát-cikláz rendszer. Az OA₂ receptort további altípusú receptorokra, OA_{2A} és OA_{2B} receptorokra különíthették el. A lassú motoneuron preszinaptikus végződésén hat az OA_{2A}, míg posztzinaptikusan az izomsejten hat az OA_{2B} receptor. Evans munkáját megelőzően, de főként azt követően, az OA receptor jellemzésére különböző fajok idegrendszerében és perifériás szövetekben számos eredmény született az adenilát-cikláz vizsgálata során. Az OA hatása e szövetekben az adenilát-cikláz serkentésén keresztül valósul meg. Annak ellenére, hogy a farmakonok hatásossági sorrendje az egyes kísérletekben némi eltérést mutat, az OA hatás farmakológiai befolyásolása alapján e receptorok az OA_{2B} típusú receptoroknak tekinthetők.

Hasonló megállapításra jutunk, ha a radioaktív jelzett OA ligand kötődésének farmakológiai befolyásolását hasonlítjuk össze. Az ³H-OA reverzibilisen, nagy affinitással és specifikusan kötődik az idegrendszer szövetéből preparált membrán pallethez. Ha a jelzett OA leszorítására használt farmakonok hatásossági sorrendjét vizsgáljuk azt látjuk, hogy az idegrendszer OA receptorának farmakológiai tulajdonsága nagymértékben azonos a 2_B típusú OA receptor farmakológiai tulajdonságával. Roeder (1992) azonban úgy gondolja, hogy az általa sáska idegrendszerben ligand kötődéssel vizsgált és jellemzett központi idegrendszeri OA receptor egy új típusú OA receptornak, OA₃ receptornak tekinthető.

- Annak érdekében, hogy eldönthessük, vajon a sáska idegrendszerében azonosított OA receptor OA₃ vagy OA_{2C}, az optikus lebeny OA receptorát kétféle módszerrel elemeztük: az OA stimulált adenilát-cikláz és az ³H-OA kötődés farmakológiai tulajdonságainak vizsgálatával.

Az OA receptor tulajdonságát néhány laboratóriumban már klónozott receptoron is tanulmányozták. Az ³H-yohimbin kötődés farmakológiai tulajdonsága alapján az OA₂ receptorhoz hasonlónak agonista specifikus OA/TA receptornak gondolják. A kísérletek során azonban a yohimbinnek nem tisztázták olyan alapvető ligandtulajdonságát, mint a receptoron való kötődésének reverzibilitása.

- Ezért vizsgáltuk azt, hogy az ³H-yohimbin alkalmazható-e ligandként az OA receptor jellemzésére.

Rovarak vonatkozásában kevés adat áll rendelkezésünkre a TA szerepéről és receptoráról. A peptid természetű proktolin egyedüli antagonistájaként írták le. Lehetséges transzmitter szerepének bizonyítékait írták le sáskán, idegszövetében pedig TA receptort azonosítottak. *Drosophilában* a TA receptor negatívan kapcsolódik az adenilát-cikláz rendszerhez. A TA klónozott receptorát *Locusta* idegrendszeréből és *Drosophila* fejéből is előállították.

I. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. A kísérleti állatok tartása, preparálása, szövethomogenizátumok készítése

Kísérleteinket afrikai vándorsáskán (*Locusta migratoria migratorioides* L.) végeztük. Az állatokat intézetünkben tenyésztettük, 12 órás nappali és éjszakai periódusváltásokkal. Táplálékuk frissen hajtattott búzából, valamint zabpelyhből állt. Kísérleteinket kifejezett 2-3 hetes állatokon végeztük. A kísérletek során a cerebrális gangliont, az optikus lebenyeket, a garataltati gangliont, a torakális ganglionokat és az abdominális ganglionokat külön preparáltuk. A szöveteket azonnal felhasználtuk, vagy gyors fagyasztás után -40 °C-on rövid ideig tároltuk. A tárolás során ellenőriztük a szövetek monoamin szintjét és dekarboxiláz aktivitását.

2. A monoaminok HPLC-s analízise

A szövetek endogén monoamin szintjének méréséhez a szöveteket homogenizálás és centrifugálás után közvetlenül injektáltuk, vagy a HPLC-s analízis előtt folyékony ioncserés módszerrel, ill. alumínium-oxidos szelektív adszorpcióval előtisztítottuk. Közvetlen injektálás során a szöveteket 0,1 N-os perklorásv oldatban homogenizáltuk, majd centrifugáltuk. A zsírsav lepedék eltávolításához a felülúszót GF/C-s üvegszál szűrőpapíron szűrtük, majd a minták aliquotját HPLC-be injektáltuk.

A DA és a 5HT detektálásához Waters 460 típusú elektrokémiai detektort (0,65 V-on), míg a tiramin meghatározásához Waters M 470 scanning fluoreszcens detektort (ex/em: 280nm/ 303nm) használtunk. A HPLC-s rendszer Waters 510-es pumpából, Waters WISP 712 automata injektorból állt.

3. Az 5HTP/DOPA és a TYR -dekarboxilázok biokémiai jellemzése

3.1. Inkubációs elegyek

Az enzimreakciók vizsgálatát első megközelítésben cerebrális ganglionok homogenizátumából végeztük. A szövetet foszfát pufferben homogenizáltuk 1:10 térfogatarányban. Az inkubációs elegy homogenizátumot, piridoxál-5'-foszfátot (PLP) oldatot, valamint szubsztrátot tartalmazott. A szubsztrát és PLP koncentrációját a kinetikai elemzések során változtattuk. Az enzimreakciót belső standardot tartalmazó foszfát pufferrel állítottuk le.

A tisztított dekarboxiláz enzimek esetében az inkubációs elegy összetétele attól függően változott, hogy az enzimek mely tulajdonságát vizsgáltuk. Vizsgáltuk az 5HTP/DOPA-dekarboxiláz és a TYR-dekarboxiláz enzimek szubsztrátspecifitását, kofaktor (PLP) függését, pH optimumát, valamint dekarboxiláz (α -metil-DOPA, α -metil-meta-TYR, meta-hidroxibenzilhidrazin) és tirozin-hidroxiláz gátlószerek (α -metil-para-TYR) dekarboxiláz aktivitásra gyakorolt hatását. Az IC_{50} értékeket és az enzimkinetikai paramétereket GraFit számítógépes program segítségével határoztuk meg.

A minták fehérjetartalmát a BioRad által szabványosított módszer szerint határoztuk meg (BioRad Protein Assay, 1979.).

3.2. Az 5HTP/DOPA és TYR-dekarboxilázok szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata cerebrális ganglion homogenizátumában

A ganglionokat szacharóz oldatot (pH=7,3) tartalmazó üveg potterben kézzel óvatosan elhomogenizáltuk. A homogenizátum egyik feléből centrifugálás után vizsgáltuk a pellet és a felülúszó frakciók dekarboxiláz aktivitását 5HTP, DOPA és TYR szubsztrátokra. Így a membránhoz kötött és a citoplazmában oldott dekarboxilázok megoszlásáról nyertünk információt.

A homogenizátum másik feléből többlépcsős differenciál centrifugálással, majd Ficoll grádiens centrifugálással nyertük a szinaptoszómális frakciót. A kísérlet során mindhárom szubsztráttal mértük a különböző frakciók dekarboxiláz aktivitását.

3.3. Az 5HTP/DOPA-dekarboxiláz és a TYR-dekarboxiláz tisztítása

§ 3.3.1. Előtisztítás ammónium-szulfáttal

A cerebrális ganglionokat foszfát pufferben homogenizáltuk, majd centrifugálás után a felülúszóban szoba hőmérsékleten 35%-os telítettségig $(NH_4)_2SO_4$ -ot oldottunk fel. A kicsapódott fehérjéket centrifugálással üleptettük, majd a felülúszó eltávolítása után az előtisztított pellet frakciót foszfát pufferben vettük fel és gélkromatográfiás oszlopra vittük tovább.

§ 3.3.2. Gélkromatográfiás elválasztás és tisztítás

Az előtisztított fehérjefrakciót Sephachryl S-300 HR gélre vittük tovább. Eluálószerként foszfát puffert alkalmaztunk. Az eluátum dekarboxiláz aktivitásukat DOPA, valamint TYR szubsztrátokra monitoroztuk. Az aktív frakciókat gyűjtöttük, majd az egy csúcshoz tartozó mintákat összeöntöttük, majd liofilizáltuk. Liofilizálás után a tisztított fehérjéket $-40^\circ C$ -on tároltuk és felhasználás előtt ellenőriztük a fehérjére vonatkoztatott enzimaktivitásuk változását.

3.4. Molekulatömeg meghatározás gélkromatográfiával

Az elválasztott és tisztított dekarboxilázok molekulatömeg meghatározását szintén Sephachryl S-300 HR gélkromatográfiával határoztuk meg. Az oszlopról távozó eluátum fényelnyelését Waters diódasoros detektorral 280nm-en folyamatosan monitoroztuk, az eluátum frakcióit gyűjtöttük, dekarboxiláz aktivitásukat mértük. A molekula tömeg meghatározás kalibrációjához a következő fehérjéket alkalmaztuk:

500 μg apoferritin (ló lép) (MW=480000)

250 μg bovine serum albumin (MW=67000)

250 μg ovalbumin (MW=45000)

250 μg mioglobin (ló szív) (MW=18000).

3.5. *In vivo* enzimgátlások vizsgálata

Az állatokat sáska ringerben feloldott dekarboxiláz és tirozin-hidroxiláz inhibitorokkal injektáltuk. Kontrollként 100 μl ringert alkalmaztunk. Néhány óra elteltével preparáltuk a cerebrális ganglionokat, optikus lebenyeket, garatalatti, torakális és abdominális ganglionokat, majd mértük monoamin tartalmukat.

4. Tirozin -hidroxiláz aktivitás vizsgálata a cerebrális ganglionban

4.1. Kísérletek homogenizátumokkal

Cerebrális ganglionok homogenizátumában a gerincesek tirozin-hidroxiláz enzimére kidolgozott módszerek alapján vizsgáltuk a tirozin-hidroxiláz aktivitást. Az inkubációs elegy tetrahydro-bioperint, katalázt vagy Fe(II) ionokat, valamint szubsztrátként TYR-t tartalmazott különböző koncentrációban.

4.2. TYR abdominális injektálása

A kísérletben négy csoportot alakítottunk ki, melyeket abdominálisan injektáltunk. Az első a kontrol, a második a TYR-nal kezelt, a harmadik az m-hidroxibenzilhidrazinnal és a negyedik TYR-nal és m-hidroxibenzilhidrazinnal együttesen kezelt csoport volt.

4.3. Cerebrális ganglionok inkubálása ^3H -TYR-nal

Az intakt ganglionokat 1 ml $5\mu\text{Ci}$ ^3H -TYR-t tartalmazó sáska ringerben három óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A perklórsavas homogenizálást, majd tisztítást követően vizsgáltuk az OA, N-acetil-OA, DA, N-acetil-DA, TA és N-acetil-TA csúcsokba bepült radioaktivitást. A mintákat minden esetben folyékony szcintillációs folyadékban oldottuk. A radioaktivitás méréséhez LKB 1211 típusú folyékony szcintillációs spektrofotométert használtunk.

5. A cerebrális ganglion DOPA forgalmának vizsgálata

5.1. DOPA abdominális injektálása

Állatonként 100 μg DOPA-t injektáltunk abdominálisan az előző injektálásokkal megegyező módon és mértük az állatok cerebrális ganglionjában a DOPA, DA és NAcDA tartalom változását.

5.2. A cerebrális ganglion DOPA felvételének vizsgálata

Vizsgáltuk a cerebrális ganglion DOPA felvételét. A ganglionokat óvatosan kiperaráltuk, majd ringerben mostuk és hármasával 50 μl inkubációs elegybe helyeztük. A mosásra a haemolymphában jelenlévő magas DOPA koncentráció miatt volt szükség. Az inkubációs elegy ringer alapú oldat volt, mely hideg DOPA-t, $1\mu\text{Ci}$ ^{14}C -DOPA-t, valamint dekarboxiláz gátlószerként 1 mM m-hidroxibenzilhidrazint tartalmazott. A DOPA koncentrációja 1-5000 μM között változott. Az inkubációs idő a felvétel kinetikai vizsgálatánál 10 perc volt 32 °C-on. Kontrolként 0 °C-on inkubált ganglionok DOPA felvételét mértük. Az

inkubáció végén 5ml 0 °C-os ringerrel mosva állítottuk le a folyamatot. A ganglionokat 500 μl Protosol típusú szövethomogenizálóban oldottuk fel 32 °C-on, majd az oldatot 7 ml Triton X-100 toluén alapú szcintillációs oldatba helyeztük. Mivel a Protosol kemilumineszcenciája csak 24 óra elteltével szűnik meg, a ganglionok által felvett jelzett DOPA mennyiségét ez idő eltelte után tudtuk csak mérni folyékony szcintillációs spektrofotométerrel. Vizsgáltuk a felvételi folyamat idő és hőmérsékletfüggését.

Egy másik kísérletsorozatban HPLC-vel mértük az izolált ganglionok DOPA felvételének kinetikáját. Az előzőekben leírt módszertől csak annyiban térünk el, hogy a ganglionokat egyesével inkubáltuk és a folyamat leállítása után 100 μl 0,1 N HClO_4 oldatban homogenizáltuk, mely belső standardként m-hidroxibenzilhidrazint tartalmazott. A ganglionok DOPA tartalmát az előzőekben említett alumínium-oxidos tisztítással határoztuk meg.

6. DOPA, DA és NAcDA tartalom, valamint a dekarboxiláz aktivitás meghatározása, lokalizációja a haemolympha sejtes elemeiben és a szérumban

A haemolympha gyűjtésére az ún. „flash” módszert alkalmaztuk (Chino és mtsai, 1987). A módszer lényege hogy a nyaki membrán átszúrása előtt a sáskát lehűtjük és 200 μl a lehűtött sáskával azonos hőmérsékletű ringerrel abdominálisan (utolsó előtti potrohszelvény előtt) injektáljuk, majd a megnövekedett turgorú állatból gyűjtjük a haemolymphát. Ennek a módszernek az a fő előnye a hagyományos előinjektálás nélküliekkel szemben, hogy a haemolymphát az állat testében hígítjuk és ha hideg edénybe gyűjtjük, akkor sem koagulálódik, ha nem hígítjuk tovább. A koaguláció az előinjektálás nélküli módszereknél a hideg ringerrel történő hígítás ellenére is nagyobb valószínűséggel bekövetkezik. Ennek az a magyarázata, hogy a ringer injektálása nélkül gyűjtött haemolymphában olyan fehérjék aktiválódnak, amelyek a haemolympha koagulációjában kulcsfontosságúak és a folyamatot a továbbhígítás sem tudja teljesen megakadályozni. Mivel a további vizsgálatokhoz a haemolymphát centrifugálással sejtes elemeire és szérumba különítettük el fontos volt a koaguláció lehetőségének teljes kizárása. A DOPA, DA és NAcDA tartalom, valamint a dekarboxiláz aktivitás meghatározása az előzőekben ismertetett módon történt.

7. OA receptor jellemzése az optikus lebenyben

Az optikus lebenyt felnőtt állatokból preparáltuk és a membránpelletet a korábban leírt módszer szerint készítettük (Hiripi és mtsai, 1994). A szövetet 40 térfogat hideg 50 mM-os tris pufferben (pH=7.4) homogenizáltuk Politron PT-10-es típusú homogenizátorral. A homogenizátumot háromszor centrifugáltuk

15 percig 50000g-n közbelső reszuszpendálással. Az adenilát-cikláz méréshez a membránpellet végső reszuszpendálása 50 mM-os (pH=7,4) 0,5 mM EGTA-t tartalmazó Tris-maleát pufferben, míg a kötődés kísérletekhez 50 mM-os (pH=7,4) Tris-HCl pufferben történt. Az adenilát-cikláz aktivitásának mérésekor a 0,5 ml térfogatú reakció elegy 80 mM Tris-maleát (pH=7,4) puffert, 10 mM teofilint, 2 mM MgSO₄-t, 0,5 mM EGTA-t és 0,1 mM GTP-t, 0,5 mM ATP-t, a vizsgált farmakonokat és 1,5 mg nedvestömegű optikus lebenyből készült membrán pelletet tartalmazott. A reakció elegyet 20°C-on előinkubáltuk és ATP hozzáadással indítottuk a reakciót. Az inkubálást 30°C-on 5 percig végeztük egy rázó vízfürdőben, majd a leállításhoz az inkubációs elegyet 2 percre forró vízbe helyeztük. A csöveket lehűtés után 10 percig 10000 g-n centrifugáltuk. A felülúszó 2 x 50 mikroliterét használtuk párhuzamos kísérletekben a ciklikus AMP meghatározására az Amershamtól vásárolt Kit útmutatása szerint.

A ³H-jelzett ligand kötődésének vizsgálatakor az inkubációs elegy térfogata 2 ml volt, és 50 mM Tris-HCl (pH=7,4) puffert, 20 mg nedves szövetnek megfelelő membrán pelletet, 2 nM ³H-OA-t, vagy 2 nM ³H-yohimbint, valamint farmakonokat tartalmazott. Az elegyet 25°C-on 20 percig inkubáltuk, majd az inkubációt gyors szűréssel fejeztük be. A szűrés GF/C üvegszál szűrőpapíron történt és a szűrőpapírt 3 x 5 ml hideg pufferrel mostuk, majd toluol-triton X-100 szcintillációs elegyben egy éjszakán át extraháltuk és a radioaktivitást mértük.

8.1. A klórdimeform (CDM) származékainak hatása a cerebrális ganglion OA, TA, DA, 5HT és GABA receptorain

A CDM származékok szintézise Hollingworth laboratóriumában (USA) a korábban leírt módszer szerint történt (1976). A formamidinek hatását OA, TA, DA, 5HT és GABA receptorokon elemeztük. Az adott receptoron specifikus, trícium jelzett ligandok kötődését vizsgáltuk. A ligandok ³H-OA (32,4 Ci/mmol), ³H-TA (40 Ci/mmol), ³H-halopridol (14 Ci/mmol), ³H-5HT (28 Ci/mmol) és ³H-flunitrazepam (90 Ci/mmol) voltak. A kísérletekhez sáska cerebrális ganglionját használtuk. Az OA, TA, DA és 5HT receptorok vizsgálatához a ganglionokat fagyasztottuk, majd a következő napig -40 °C-on tároltuk. A lefagyasztott ganglionokat 1:40 szövet-térfogatarányban homogenizáltuk jéghideg 50 mM (pH 7,4) Trisz-HCl pufferben, majd háromszor centrifugáltuk 50000 g-n 15 percig. Az endogén ligandok hatástalanítása végett a második centrifugálás után a pelletet 50mM , pH 7,4 Trisz pufferben reszuszpendáltuk és 30 °C-on 15 percig inkubáltuk. A harmadik centrifugálás végén a pelletet 50 mM Trisz pufferben vettük fel. Az inkubációs elegyek 2 ml-e (50 mM Trisz puffer, pH 7) 20 mg nedves tömegnek megfelelő mennyiségű membrán pelletet, 2 nM triciált ligandot és változó mennyiségben a vizsgált anyagot tartalmazta. Az inkubációt a szövet hozzáadásával indítottunk, ami 30 °C-on 20 percig tartott. A mintákat vákuummal GF/C

szűrőn gyorsan szűrtük, majd háromszor 5 ml jéghideg pufferrel mostuk a pelletet. A szűrőpapíron fennmaradó szövetet 12 órán át extraháltuk a Triton X-100-toluén alapú szcintillációs eleggyel, majd mértük a radioaktivitást.

A GABA receptorok jellemzését Robinson és mtsai (1986) módszere alapján végeztük. A nem specifikus kötődést 10 µM OA, TA, DA és 5HT, valamint 100 µM diazepam jelenlétében mértük.

A kísérleteket háromszor ismételtük, a trícium jelzett ligandok kötődésgátlásánál minden egyes anyag esetén hat koncentrációt vizsgáltunk. Az IC₅₀ értékeket illesztőprogram segítségével, míg a K_i értékeket a következő egyenlet alapján határoztuk meg:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [S]/K_d}$$

8.2. A demetil-klórdimeform (DCDM) származékok hatása a sáska táplálkozására

Következő lépésként azt vizsgáltuk, hogy a DCDM-hez, mint alapmolekulához viszonyítva mely funkció csoportoknak van alapvetően szerepük az OA receptoron kifejtett hatásban. A DCDM származékok hatását élő állatok táplálkozási aktivitásának befolyásolásán keresztül vizsgáltuk. Ahhoz, hogy ezt megtehesük a DCDM származékok sáskára vonatkoztatott LD₅₀ értékeit határoztuk meg. Ehhez a származékokat fiziológiás sóoldatban oldottuk fel és minden dózist 100 µl-ben injektáltunk abdominálisan. Minden származékból 5 dózist alkalmaztunk és az injektálást követő 48 órás mortalitás alapján számítottuk az LD₅₀ értékeket. A kontrol állatokat 100 µl fiziológiás sóoldattal kezeltük.

A táplálkozásgátlás vizsgálatához az állatokat abdominálisan bejuttatott szubletális dózisu származékkal (LD₅₀ értékek felével) injektáltuk. Az injektált dózist 100 µl fiziológiás sóoldat tartalmazta, a kontrolként vizsgált állatokat azonos térfogatú fiziológiás sóoldattal kezeltük. 6 órával az injektálás után az állatok azonos mennyiségű frissen hajatott búzát kaptak és mértük az elfogyasztott táplálék mennyiségét a kontrol %-ában.

A kinetikai és farmakológiai adatok elemzésére és grafikus megjelenítésére GraFit illesztőprogramot használtunk.

IV. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Az OA és a TA fontos szerepet töltenek be a rovarok idegrendszerében. Szintézisüket és hatásmechanizmusukat széles körben kutatták és kutatják napjainkban is. A kutatások során olyan alapproblémákat felvető kérdések merülnek fel, melyek nélkül az eddigi eredményeket nem, vagy csak nehezen értelmezhetjük. Munkánk során néhány ilyen hiánypótló kérdésre kerestük a választ. Kísérleteinket afrikai vándorsáskán (*Locusta migratoria migratorioides* L.) végeztük.

Eredményeinket az alábbiakban foglalhatjuk össze:

- A rovarok idegrendszerében két dekarboxiláz enzim, a TYR-dekarboxiláz és az 5HTP/DOPA-dekarboxiláz, különíthető el. A két enzim idegşövetből gélkromatográfiával elválasztható és tisztítható.
- A TYR-dekarboxiláz végzi a TYR, míg az 5HTP/DOPA-dekarboxiláz az 5HTP és a DOPA dekarboxilációját. A TYR-dekarboxiláznak az 5HTP nem adekvát szubsztátja, míg az 5HTP/DOPA-dekarboxiláz kisebb affinitással ugyan, de képes dekarboxilálni a TYR-t is.
- A gerinceseken specifikus tirozin-hidroxiláz gátlószerként ható anyagok (pl. α -metil-m-TYR) nem használhatóak rovarok esetében, mert *in vitro* és *in vivo* is gátolni képesek a TYR-dekarboxiláz és az 5HTP/DOPA-dekarboxilázok működését. Az α -metil-m-TYR és az α -metil-p-TYR alkalmas rovarok központi idegrendszerében DA szelektív kiűritésére.
- Tirozin-hidroxiláz enzim aktivitását idegşövetben az előzetes irodalmi adatokkal megegyezően sem *in vitro* enzimkísérletekkel, sem *in vivo* módszerekkel nem tudtuk kimutatni. A TYR→DOPA közvetlen átalakítás hiánya megkérdőjelezi a rovar agyban a tirozin-hidroxiláz jelentőségét.
- Az idegşetek funkcionális DOPA szükségletének kielégítése a ganglionok és a haemolympha között működő DOPA felvevő mechanizmuson keresztül valósul meg. A DOPA felvét gyors, telítéssel jellemezhető folyamat, mely egyben kapcsolatot is jelent a haemolympha és a központi idegrendszer katecholamin képzési folyamatok között.
- A sáska optikus lebenyében OA₂ típusú receptor van jelen, mely az adenilát-cikláz rendszerhez kapcsolódva fejti ki hatását. A ³H-jelzett OA specifikusan és nagy affinitással kötődik az optikus lebenyből készült membránpreparátumhoz. A kétfázisú disszociáció a racém elegyként jelenlévő (+) és (-) OA-nak a receptorhoz való eltérő affinitásával magyarázható.
- A cerebrális ganglionban azonosított kissé eltérő OA receptor inkább OA_{2C} receptornak és nem OA₃ receptornak tekinthető.
- A yohimbin nem alkalmas a rovarok OA receptorának jellemzésére, mivel az OA receptorhoz alacsony az affinitása és kötődése a receptorhoz irreverzibilis.
- A CDM származékok közül a DCDM az egyik leghatásosabb agonista vegyület a sáska OA receptorán. A vizsgált receptortípusok közül az OA receptorhoz a legnagyobb az affinitása. A CDM demetilálódás

után DCDM-ként fejti ki hatását. A CDM szubsztitúciós származékai közül a leghatásosabb a metil ill. a halogén csoport 2,4 helyzetű diszubsztitúciója. A 2,4-dimetil szubsztitúció eredményezi a legaktívabb vegyületet, ezt követi a 2,4-diklór illetve a 2-metil-4-klór kombináció. Az egyéb származékok kötődése az OA receptorhoz korrelál a sáska táplálkozásának gátlásával, így bizonyítható a receptorhatásuk.

V. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

II. Publikációk

A disszertáció alapjául szolgáló tanulmányok

Hiripi L., Nagy L. and Hollingworth R. M. (1999) *In vitro* and *in vivo* effects of formamidines in locust (*Locusta migratoria migratorioides*). Acta Biol. Hung. 50(1-3), 81-87.

Nagy L. and Hiripi L. (2002) Role of tyrosine, DOPA and decarboxylase enzymes in the synthesis of monoamines in the brain of the locust. Neurochem. International, 41, 9-16.

A disszertáció alapjául szolgáló konferenciaszereplések

Hiripi L. és Nagy L. (1996): A szerotonin receptor vizsgálata *Limnaea stagnalis* L. idegrendszerében. MITT III. Konferenciája, Balatonfüred

Nagy L. és Hiripi L. (1997): Klórdimeform analógok hatásainak vizsgálata afrikai vándorsáskán. MITT IV. Konferencia, Gödöllő

Nagy L., Hiripi L. and R.F. Hollingworth R.F. (1997): Investigation of the effect of chlordimeform analogues on locust, *Locusta migratoria migratorioides*. Göttingen Neurobiology Conference, Göttingen

Nagy L., Hiripi L. and Hollingworth R.F. (1997): Investigation of the effect of chlordimeform analogues on locust, *Locusta migratoria migratorioides*. Simpler Nervous Systems. 5th East European Conference, Moscow.

Hiripi L., **Nagy L.** és Elekes K. (1998): Dopamin receptor jellemzése *Lymnaea stagnalis* központi idegrendszerében. MITT V. Konferencia, Debrecen

Nagy L. és Hiripi L. (1998): 5-HTP, DOPA és tirozin dekarboxilációja rovaragyban. MITT V. Konferencia, Debrecen

Nagy L. and Hiripi L. (1998): Separation of decarboxylases producing catecholamines, indolalkylamines and phenolamines in locust. ENA Conference, Berlin

Nagy L. and Hiripi L. (1999): Enzymatic pathways of tyrosine in the CNS of *Locusta migratoria migratorioides* L. ISIN, Tihany

Nagy L. és Hiripi L. (2000): Dopamin és receptorai a sáska táplálkozási rendszerében IBRO-MITT Milleniumi Konferencia, Budapest

Hiripi L., **Nagy L.**, Kiss T., Erdélyi L és Elekes K. (2001): A nyálmirigy szerotonerg szabályozása gasztropódákban (*Helix, Lymnaea*). MITT VIII Konferencia, Szeged

Nagy L., Hiripi L. és Elekes K. (2001): A nyálmirigy aminerg szabályozása vándorsáskában. MITT VIII. Konferencia, Szeged

Hegedüs E. Hiripi L., **Nagy L.** és Elekes K. (2001): Hisztaminerg rendszer gasztropódák (*Helix, Lymnaea*) központi idegrendszerében. MITT VII Konferencia, Szeged

Hegedüs E., Hiripi L., **Nagy L.** and Elekes K. (2001): Serotonergic innervation of the salivary gland in gastropods (*Helix, Lymnaea*) : immunocytochemistry, biochemistry and physiology. 28th Göttingen Neurobiology Conference,

Nagy L. and Hiripi L. (2001): Possible role of DOPA uptake in DA synthesis in the locust brain. 28th Göttingen Neurobiology Conference, Göttingen

Egyéb tanulmányok

Hiripi L., **Nagy L.**, Kalmár T., Kovács A. and Vörös L. (1998) Insect (*Locusta migratoria migratorioides*) Test Monitoring the Toxicity of Cyanobacteria. NeuroToxicology 19(4-5), 605-608

Hiripi L., **Nagy L.**, Kovács A. és Vörös L. (1997) Balatoni kéalgák toxicitásának vizsgálata gerinces és gerinctelen állatokon. (XXXVIII. Hidrobiológus Napok, Tihany, 1996) Hidrológiai közlöny, 77, 67-68.

Nagy L., Hiripi L., Kovács A. és Vörös L. (1998) Cyanobaktériumok toxicitásának vizsgálata balatoni halakon. (XXXIX Hidrobiológus Napok, Tihany, 1997) Hidrobiológiai közlöny, 78, 298-299

Hiripi L. és **Nagy L.** (2000) Exoenzimok szerepe a Balaton anyagforgalmában. In A Balaton kutatásának 1999. évi eredményei (Ed.: Somlyódy L. és Banczerowski J.) MTA Budapest

Hiripi L. és **Nagy L.** (2001) Exoenzimok szerepe a Balaton anyagforgalmában. In A Balaton kutatásának 2000. évi eredményei (Ed.: Mahunka S. és Banczerowski J.) MTA Budapest

Egyéb konferencia szereplések

Hiripi L., **Nagy L.**, Kovács A. and Vörös L. (1997): Toxicity of the cylindrospermopsin produced by cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii*. 6th Meeting of the International Neurotoxicology Association, Szeged

Hiripi L. , **Nagy L.**, Kovács A. és Vörös L. (1996): Balatoni kéalgák toxicitásának vizsgálata gerinces és gerinctelen állatokon. XXXVIII. Hidrobiológus Napok, Tihany

Nagy L., Hiripi L., Kovács A. és Vörös L. (1997): Cyanobaktériumok toxicitásának vizsgálata balatoni halakon. XXXIX Hidrobiológus Napok, Tihany